

J. Hort. Indonesia 4(1):44-53. April 2013.

Pengaruh Sukrosa dan Fotoperiode terhadap Embriogenesis Somatik Jeruk Keprok Batu 55 (*Citrus reticulata* Blanco.)

*Effects of Sucrose and Photoperiod on Somatic Embryogenesis of Citrus Keprok Batu 55 (*Citrus reticulata* Blanco.)*

Wahyu Widoretno^{1*}, C. Martasari², dan Nirmala FD².

Diterima 11 Oktober 2011/Disetujui 21 Oktober 2012

ABSTRACT

This study aimed at determining the effect of sucrose and photoperiod treatment on the growth and development of somatic embryos in citrus Keprok Batu 55. Citrus somatic embryos were induced from nusellus explants cultured on MT (Murashige and Tucker) medium + 146 mM sucrose + 500 mg L⁻¹ malt extract. After 3 times subcultures, somatic embryos were cultured on medium with several concentrations of sucrose (146, 171, 196, and 246 mM) or treated with different photoperiod (8, 12, and 16 hours). Treated somatic embryos were regenerated into plantlets. The research results showed that the addition of sucrose on medium did not affect on fresh weight of somatic embryo at 2 weeks of culture but decreased the fresh weight of somatic embryos at 4 weeks of culture. The higher the sucrose added to the medium, the more embryo somatic fresh weight decrease. Induction and growth of somatic embryo was also influenced by culture conditions. Fresh weight of somatic embryos was cultured with photoperiod 12 hours day⁻¹ for 2 and 4 weeks higher than the fotoperiode 8 hours day⁻¹. However, the fresh weight of somatic embryos decreased if photoperiod was increased to 16 hours day⁻¹. Induced somatic embryos on medium containing high sucrose (246 mM) produced more plantlets with higher size than those with low sucrose. Somatic embryos cultured with photoperiod 12 hours day⁻¹ produced more plantlets than those of photoperiod 8 and 16 hours day⁻¹. Nevertheless, the somatic embryos were cultured with photoperiod 16 hours day⁻¹ produced plantlets with higher sizes than photoperiod 8 and 12 hours day⁻¹.

Keywords: medium, Murashige and Tucker, nuselus, plantlet

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan sukrosa dan fotoperiode terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik jeruk Keprok Batu 55. Embrio somatik diinduksi dari eksplan nuselus yang dikultur pada medium MT (Murashige dan Tucker) + sukrosa 146 mM + ekstrak malt 500 mg L⁻¹. Setelah 3 kali subkultur, embrio somatik dikultur pada media MT dengan penambahan beberapa konsentrasi sukrosa (146, 171, 196, dan 246 mM) atau diperlakukan dengan fotoperiode yang berbeda (8, 12, dan 16 jam hari⁻¹). Embrio somatik hasil perlakuan selanjutnya diregenerasikan menjadi planlet. Hasil penelitian menunjukkan penambahan sukrosa pada medium tidak berpengaruh terhadap bobot basah embrio somatik pada umur kultur 2 minggu tetapi menurunkan bobot basah embrio somatik pada umur kultur 4 minggu. Semakin tinggi sukrosa yang ditambahkan dalam medium, penurunan bobot basah embrio somatik juga semakin meningkat. Induksi dan pertumbuhan embrio somatik juga dipengaruhi oleh kondisi kultur. Bobot basah embrio somatik yang dikulturkan selama 2 dan 4 minggu dengan fotoperiode 12 jam hari⁻¹ lebih tinggi dibandingkan dengan fotoperiode 8 jam hari⁻¹. Namun demikian apabila fotoperiode ditingkatkan menjadi 16 jam hari⁻¹, bobot basah embrio somatik mengalami penurunan. Embrio somatik yang diinduksi pada medium yang mengandung sukrosa tinggi (246 mM) mampu beregenerasi menjadi planlet lebih banyak dan berukuran lebih tinggi dibandingkan dengan sukrosa rendah. Embrio somatik yang dikultur dibawah fotoperiode 12 jam hari⁻¹ menghasilkan planlet lebih banyak dibandingkan fotoperiode 8 dan 12 jam hari⁻¹. Namun demikian, embrio somatik yang dikultur dengan fotoperiode 16 jam hari⁻¹ mampu menghasilkan planlet yang berukuran lebih tinggi dibandingkan dengan fotoperiode 8 dan 12 jam hari⁻¹.

Kata kunci: medium, Murashige dan Tucker, nuselus, planlet

¹ Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Brawijaya, Jl. Veteran Malang, 65145. Phone/Fax. 341-575841, E-mail: wahyu_widoretno@yahoo.com (*penulis korespondensi)

² Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Batu, Malang

PENDAHULUAN

Jeruk merupakan salah satu komoditas yang dikembangkan di Indonesia dan sangat diminati masyarakat luas karena kandungan gizi, sumber kalori dan rasanya yang khas. Kebutuhan jeruk dari tahun ke tahun semakin meningkat sedangkan produktivitasnya semakin menurun. Untuk memenuhi kebutuhan tersebut diperlukan pengembangan luas area tanam dan penyediaan bibit jeruk (Anonim, 2007).

Ketersediaan bibit bermutu dalam jumlah banyak dan seragam diperlukan untuk memenuhi kebutuhan pengembangan perkebunan jeruk. Untuk mengatasi masalah tersebut dikembangkan teknik perbanyakan tanaman jeruk secara *in vitro* melalui embriogenesis somatik dari eksplan nuselus. Namun tanaman jeruk hasil embriogenesis somatik ini memiliki masa juvenil yang lama sekitar 4 – 5 tahun, sehingga teknik ini baru menjamin perbanyakan batang bawah jeruk. Oleh karena itu modifikasi medium dan kondisi kultur perlu dilakukan untuk meningkatkan efisiensi embriogenesis somatik dan menurunkan masa juvenil tanaman hasil regenerasi dari embrio somatik.

Embriogenesis somatik dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti genotip, karbohidrat, zat pengatur tumbuh, dan fotoperiode (Gonzalez *et al.*, 2001; Corredoira *et al.*, 2003). Di dalam kultur jaringan tanaman, karbohidrat pada umumnya dianggap sebagai sumber karbon yang diperlukan untuk keberlanjutan pertumbuhan dari jaringan yang dikultur. Sumber karbohidrat diketahui dapat mempengaruhi efisiensi embriogenesis somatik anggur (Yancheva dan Roichev, 2005). Di antara berbagai jenis karbohidrat, sukrosa seringkali dianggap karbohidrat lebih baik untuk induksi, proliferasi dan maturasi embrio (Nhut *et al.*, 2012; Alkhateeb, 2006). Pada tanaman *Medicago sativa*, bobot berat embrio, maturasi embrio, konversi embrio menjadi planlet meningkat dengan peningkatan konsentrasi sukrosa dari 3 sampai 5% dalam media maturasi (Lai dan McKersie, 1994).

Selain karbohidrat, cahaya merupakan salah satu faktor lingkungan yang mempengaruhi induksi embriogenesis somatik dan regenerasi tanaman secara *in vitro*. Kondisi dan intensitas cahaya mempengaruhi induksi dan pertumbuhan embrio somatik pada *Glycine max* L. (Lazzeri *et al.*, 1987), *Araujia sericifera* (Torné *et al.*, 2001), *Cydonia oblonga* (Morini *et al.*, 2000), *Coffea Arabica* L. (Gatica, 2008) dan *Brassica napus* (Angoshtari *et al.*, 2009; Ali *et al.*, 2007), melaporkan bahwa embrio somatik tebu dapat terbentuk secara langsung pada eksplan yang diinkubasi pada kondisi

fotoperiode 16 jam. Embrio somatik dapat diperoleh pada kondisi fotoperiodik atau dalam kondisi gelap total pada tanaman anggur (Tangolar *et al.*, 2008) dan pada kondisi gelap pada tanaman ubi (Triqui *et al.*, 2008). Sebaliknya penyinaran tinggi menghambat embriogenesis pada kedelai (Lazzeri *et al.*, 1987).

Selain merupakan faktor penting dalam pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik, sukrosa dan fotoperiode juga dapat mempengaruhi waktu pembungaan. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan sukrosa dan fotoperiode dalam induksi embriogenesis somatik dapat menurunkan masa juvenil dan mempercepat pembungaan pada tanaman hasil kultur dari beberapa spesies tanaman antara lain anggrek (Chang dan Chang, 2003), ginseng (Lin *et al.*, 2005), lilium (Langens-Gerrits, 2003), zaitun (Chaari-Rkhis, 2006) dan *Acacia* (Vengadesan *et al.*, 2003). Bunga pada tanaman jeruk Mandarin dapat terbentuk secara *in vitro* dengan persentase pembungaan sampai 47% jika eksplan tunas yang diambil pada musim panas ditumbuhkan pada media MS dengan penambahan sukrosa 90 mM dan BAP 1 mg L⁻¹ (Garcia-Luis *et al.*, 1989). Fotoperiode dapat mempengaruhi pembungaan pada tanaman jeruk mandarin dan kacang liar. Kalus embriogenik dari jeruk mandarin dan kacang liar dapat menghasilkan bunga maksimum jika dikultur pada fotoperiode 12 jam (Singh *et al.*, 2006; Aina *et al.*, 2012). Planlet *Murraya paniculata* yang berasal dari protoplas seringkali hanya menunjukkan pembungaan *in vitro* jika di bawah fotoperiode 16 jam (Jumin dan Nito, 1995), sedangkan perkembangan tunas bunga secara *in vitro* pada *Psycmorchis pusilla* teramati pada tanaman yang diinkubasi di bawah fotoperiode 20 jam (Vaz *et al.*, 2004).

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji tentang pengaruh sukrosa dan fotoperiode terhadap embriogenesis somatik jeruk Keprok Batu 55 dan kemampuan beregenerasi membentuk planlet.

BAHAN DAN METODE

Pada penelitian ini digunakan jeruk varietas Keprok Batu 55 yang merupakan jeruk lokal koleksi Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika Malang. Jeruk Keprok Batu 55 memiliki beberapa keunggulan, diantaranya warna buah hijau kekuningan hingga kuning, rasa buah manis segar, tekstur daging buah lunak, kadar vitamin C tinggi dan disukai konsumen dan petani karena produktivitasnya yang tinggi.

Induksi dan Multiplikasi Embrio Somatik

Kalus embriogenik diinduksi dari eksplan nuselus jeruk Keprok Batu 55 yang didapat dari buah muda (80-90 hari setelah anthesis) yang dikoleksi dari pohon induk dewasa. Sterilisasi permukaan eksplan dilakukan dengan merendam buah dalam alkohol 96% selama 10 detik, dan setelah itu dalam sodium hipoklorit 20% selama 20 menit. Eksplan nuselus diisolasi dari buah dan dikulturkan pada media MT (Murashige dan Tucker, 1969) yang ditambah dengan sukrosa 146 mM, ekstrak malt 500 mg L⁻¹ dan agar 8 g L⁻¹. Kalus embriogenik yang terbentuk kemudian dipindah ke media embriogenesis yang baru. Kultur diinkubasi di bawah kondisi gelap dengan suhu 25 ± 2 °C. Sub kultur embrio somatik dilakukan sebanyak 3x sebelum dilakukan perlakuan dengan sukrosa dan fotoperiode pada embrio somatik.

Perlakuan Embrio Somatik dengan Sukrosa dan Fotoperiode

Embrio somatik fase globular hasil induksi dikultur pada media dengan penambahan beberapa konsentrasi sukrosa (146, 171, 196, dan 246 mM) atau dengan perlakuan fotoperiode (8, 12, dan 16 jam hari⁻¹). Setiap perlakuan diulang 5 kali (5 botol), setiap botol ditanam 3 *clump* embrio somatik fase globuler (@ *clump* = 0.2 g). Kultur diinkubasi pada suhu 25 ± 2 °C di bawah kondisi terang. Setelah 2 dan 4 minggu diamati pertumbuhan embrio somatik dengan menimbang bobot basah embrio somatik tiap eksplan. Data bobot basah embrio somatik tiap eksplan pada masing-masing perlakuan dianalisis menggunakan ANOVA pada taraf 5%. Uji lanjut BNT dilakukan apabila terdapat perbedaan nyata antar perlakuan.

Regenerasi Planlet

Embrio somatik hasil perlakuan dengan sukrosa dan fotoperiode dikecambahkan pada media padat MT + GA₃ 2 mg L⁻¹. Setelah 2 bulan diamati pertumbuhan planlet dengan menghitung jumlah planlet yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi dan Multiplikasi Embrio Somatik Jeruk

Embrio somatik jeruk Keprok Batu 55 diinduksi dari eksplan nuselus yang diisolasi dari buah jeruk muda yang dikulturkan pada medium MT + ekstrak malt 500 mg L⁻¹ + sukrosa 146 mM. Embrio somatik mulai terbentuk dari eksplan nuselus 2 minggu setelah kultur. Embrio somatik dapat secara langsung terbentuk dari eksplan nuselus (Gambar 1A) atau secara tidak langsung melalui pembentukan kalus embriogenik (Gambar 1B). Embriogenesis langsung terjadi pada eksplan nuselus yang dikultur di bawah kondisi terang, sedangkan pembentukan kalus embriogenik terjadi jika eksplan nuselus dikultur di bawah kondisi gelap. Kalus embriogenik dan embrio somatik ini selanjutnya mengalami multiplikasi setelah disubkultur pada media baru. Kalus embriogenik yang awalnya menunjukkan friabilitas yang tinggi dengan beberapa struktur globular, selanjutnya kalus embriogenik ini berkembang menjadi beberapa embrio somatik tipe globular dan kotiledon (Gambar 1C). Subkultur kalus embriogenik dan embrio somatik pada medium baru dilakukan setiap 4 minggu sekali sebanyak 3x subkultur untuk mendapat materi embrio somatik yang cukup untuk perlakuan



Gambar 1. Induksi embrio somatik dari eksplan nuselus dan multiplikasi embrio somatik. A. Kalus embriogenik yang terbentuk dari nuselus yang dikultur di bawah kondisi terang; B. Kalus embriogenik dan embrio somatik yang terbentuk dari nuselus yang dikultur pada kondisi gelap; C Multiplikasi embrio somatik pada medium multiplikasi.

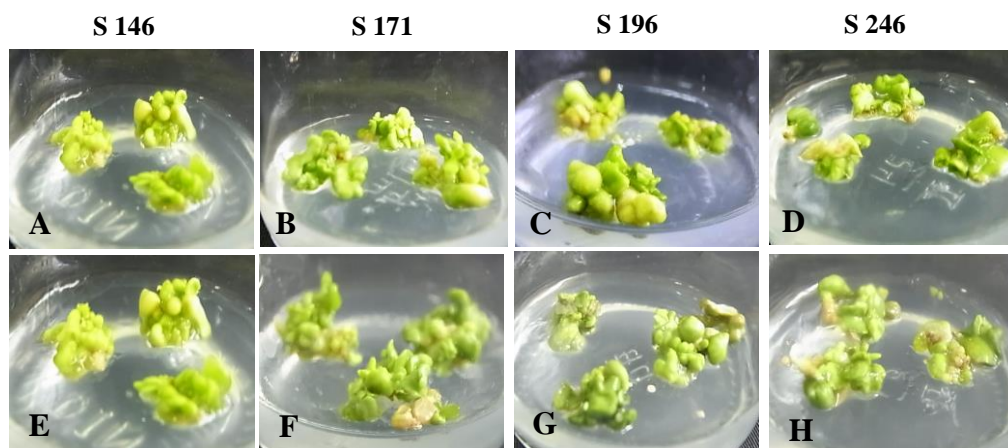
Eksplan dianggap sebagai faktor penting yang menentukan keberhasilan embriogenesis somatik (Kantharajah dan Golegaonkar, 2004; Mohamed *et al.*, 2004). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa penggunaan eksplan nuselus merupakan eksplan yang sangat sesuai untuk induksi embriogenesis somatik jeruk. Selain eksplan, cahaya juga berpengaruh terhadap pembentukan embrio. Keperluan cahaya selama proses morfogenetik *in vitro* tergantung pada spesies yang diuji. Beberapa embrio somatik terinduksi jika eksplan dikultur dalam kondisi terang (Fernando *et al.* 2002; Martin *et al.*, 2000; Martin, 2003) atau dalam kondisi gelap (Gogate *et al.*, 2003). Kondisi gelap mengarah pada pembentukan kalus embriogenik, sedangkan adanya cahaya menghasilkan pembentukan embrio pada padi (Meneses *et al.*, 2005).

Pengaruh Sukrosa dan Fotoperiode terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Embrio Somatik Jeruk

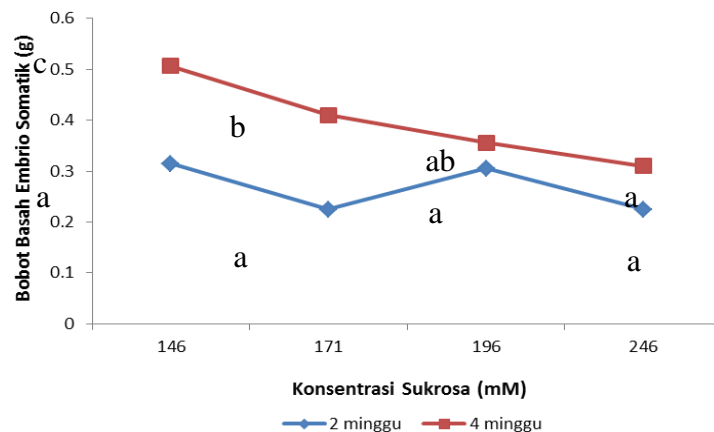
Penambahan sukrosa pada medium tampak berpengaruh terhadap pertumbuhan embrio somatik jeruk. Semakin tinggi sukrosa yang ditambahkan pada medium, pertumbuhan embrio somatik semakin terhambat (Gambar 2). Selain mempengaruhi pertumbuhan, penambahan sukrosa pada medium juga mempengaruhi warna embrio somatik dan perkembangan embrio somatik. Semakin tinggi sukrosa, embrio somatik tampak berwarna lebih hijau dengan perkembangan yang meningkat.

Pengaruh penambahan sukrosa terhadap pertumbuhan embrio somatik dilakukan dengan mengukur bobot basah embrio somatik setelah 2 dan 4 minggu kultur. Perubahan jumlah embrio somatik tidak dapat digunakan karena adanya kesulitan dalam penghitungan jumlah embrio somatik yang disebabkan embrio somatik jeruk berada dalam bentuk *clump* yang sulit dipisahkan satu sama lain.

Penambahan sukrosa pada medium berpengaruh terhadap bobot basah embrio somatik. Penurunan bobot basah embrio somatik pada penambahan konsentrasi sukrosa pada medium terlihat nyata pada umur kultur 4 minggu, sedangkan penurunan bobot basah embrio somatik pada umur kultur 2 minggu tidak signifikan (Gambar 3). Bobot basah embrio somatik pada umur kultur 2 minggu berkisar antara 0.22 – 0.32 g. Penurunan bobot basah embrio somatik pada umur kultur 4 minggu sudah mulai nampak pada penambahan sukrosa 171 mM pada media multiplikasi embrio somatik dan semakin tinggi sukrosa yang ditambahkan dalam medium penurunan bobot basah kalus juga semakin meningkat. Pada umur kultur 4 minggu, bobot basah embrio somatik pada medium yang mengandung sukrosa 146 mM sekitar 0.51 g, bobot basah embrio somatik pada medium dengan penambahan sukrosa 171 mM sebesar 0.41 g, sedangkan bobot basah embrio somatik pada medium dengan penambahan sukrosa 196 dan 246 mM hanya sekitar 0.36 dan 0.31 g.



Gambar 2. Pertumbuhan embrio somatik pada medium MT yang mengandung beberapa konsentrasi sukrosa pada umur 2 minggu (A-D) dan 4 minggu (E-H) kultur. A dan E sukrosa 146 mM (kontrol); B dan F sukrosa 171 mM; C dan G sukrosa 196 mM; D dan H sukrosa 246 mM



Gambar 3. Pengaruh penambahan sukrosa pada medium terhadap bobot basah embrio somatik jeruk pada umur kultur 2 dan 4 minggu kultur; Huruf yang sama pada masing-masing umur kultur menunjukkan tidak berbeda nyata dengan uji BNT 5%.

Induksi dan pertumbuhan embrio somatik selain dipengaruhi oleh komposisi media kultur juga dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan. Pertumbuhan embrio somatik jeruk pada kondisi kultur dengan fotoperiode 12 jam hari⁻¹ (Gambar 4A dan D) lebih baik dibandingkan dengan pertumbuhan embrio somatik pada kondisi kultur dengan fotoperiode 8 jam hari⁻¹ (Gambar 4B dan E). Sebaliknya apabila fotoperiode ditingkatkan menjadi 16 jam hari⁻¹ pertumbuhan embrio somatik justru mengalami penghambatan (Gambar 4C dan F). Selain berpengaruh terhadap pertumbuhan, perbedaan fotoperiode juga nampak mempengaruhi warna embrio somatik, embrio somatik dengan fotoperiode yang lebih lama menunjukkan warna lebih hijau dibandingkan dengan embrio somatik dengan fotoperiode yang lebih singkat.

Pengaruh fotoperiode terhadap pertumbuhan embrio somatik jeruk terlihat pada adanya perbedaan bobot basah embrio somatik pada ketiga perlakuan fotoperiode pada umur kultur 2 dan 4 minggu. Pada kedua umur kultur tersebut, bobot basah embrio somatik yang dikulturkan dalam kondisi dengan pemberian fotoperiode 12 jam lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian fotoperiode 8 jam hari⁻¹. Pada umur kultur 2 dan 4 minggu, bobot basah embrio somatik pada pemberian fotoperiode 8 jam hanya sebesar 0.29 dan 0.51 g, sedangkan bobot basah embrio somatik pada perlakuan 12 jam hari⁻¹ sebesar 0.49 dan 0.60 g. Namun demikian apabila pemberian fotoperiode ditingkatkan menjadi 16 jam hari⁻¹, berat basah embrio somatik mengalami penurunan bahkan pada fotoperiode tersebut bobot embrio somatik pada umur kultur 4 minggu jauh lebih rendah

dibandingkan dengan pemberian fotoperiode 8 minggu jam⁻¹ (Gambar 5). Pada perlakuan fotoperiode 16 jam hari⁻¹, bobot basah embrio somatik sebesar 0.33 dan 0.45 g.

Embrio somatik hasil perlakuan dengan sukrosa dan fotoperiode mampu beregenerasi membentuk planlet (Gambar 6). Embrio somatik yang diinduksi pada medium yang mengandung sukrosa tinggi (246 mM) mampu beregenerasi menjadi planlet dalam jumlah lebih banyak dan berukuran lebih tinggi dibandingkan dengan sukrosa rendah (Gambar 6A-C). Perlakuan fotoperiode 12 jam hari⁻¹ menghasilkan jumlah planlet lebih besar dibandingkan fotoperiode 8 dan 16 jam hari⁻¹. Namun demikian, perlakuan fotoperiode 16 jam hari⁻¹ mampu menghasilkan planlet yang berukuran lebih tinggi dibandingkan perlakuan fotoperiode 8 dan 12 jam hari⁻¹ (Gambar 6D-E).

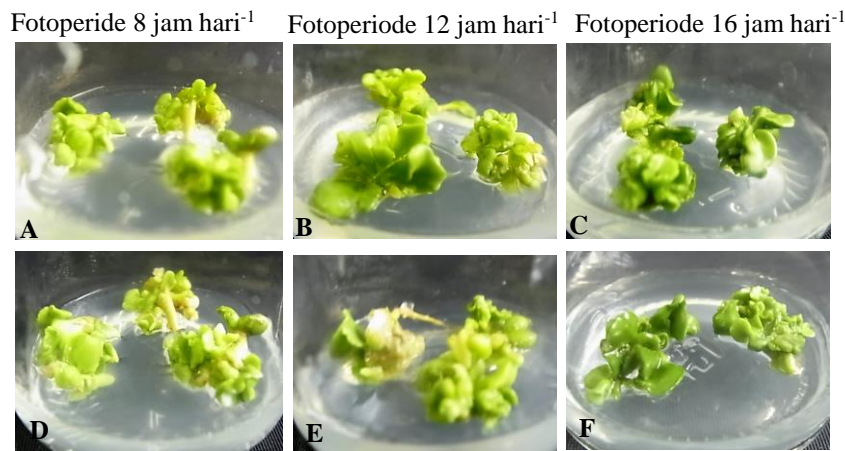
Sukrosa merupakan salah satu faktor yang sangat penting dalam perkembangan embrio somatik secara *in vitro* karena disamping sebagai sumber karbon dan energi, sukrosa juga mengatur osmolalitas medium. Pada umumnya embrio memerlukan sukrosa dalam jumlah yang lebih tinggi (88 – 175 mM) dibandingkan dengan kultur jaringan tanaman lain. Pada beberapa spesies, perkembangan embrio dapat diatur dengan mengubah kandungan gula pada medium (Slesak dan Przywara, 2003).

Penurunan bobot basah embrio dengan peningkatan penambahan konsentrasi sukrosa diatas 146 mM pada medium induksi embrio somatik menunjukkan adanya pengaruh inhibitor dari konsentrasi sukrosa tinggi pada kemampuan embriogenesis somatik jeruk. Pengaruh menghambat dari sukrosa konsentrasi tinggi terhadap

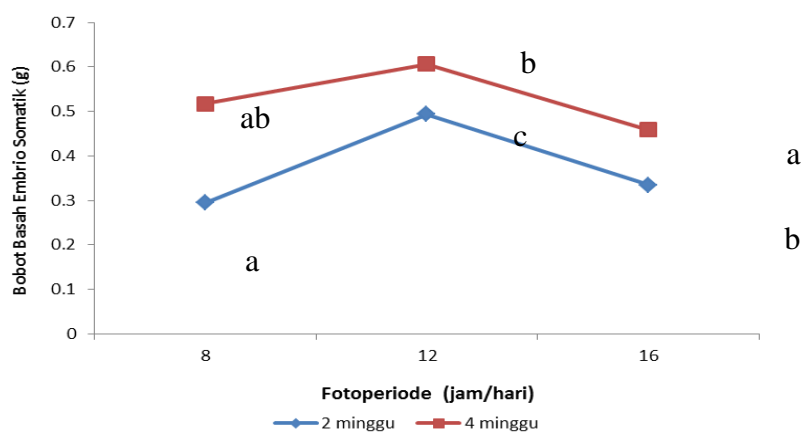
pertumbuhan embrio somatik jeruk ini kemungkinan disebabkan karena adanya perubahan osmotikum medium yang dapat mengganggu metabolisme sel embrio. Menurut Cvikrova *et al.* (1994), konsentrasi sukrosa yang tinggi menyebabkan tekanan osmotik yang lebih tinggi pada medium yang dapat menginduksi osmolisis sel sehingga menghentikan metabolisme sel dan menekan pertumbuhan kultur suspensi *Medicago sativa*. Pengaruh inhibitor dari sukrosa konsentrasi tinggi juga teramati pada embriogenesis somatik wortel (Satoh *et al.*, 2000).

Hasil penelitian Slesak dan Przywara (2003), menunjukkan bahwa konsentrasi karbohidrat tinggi

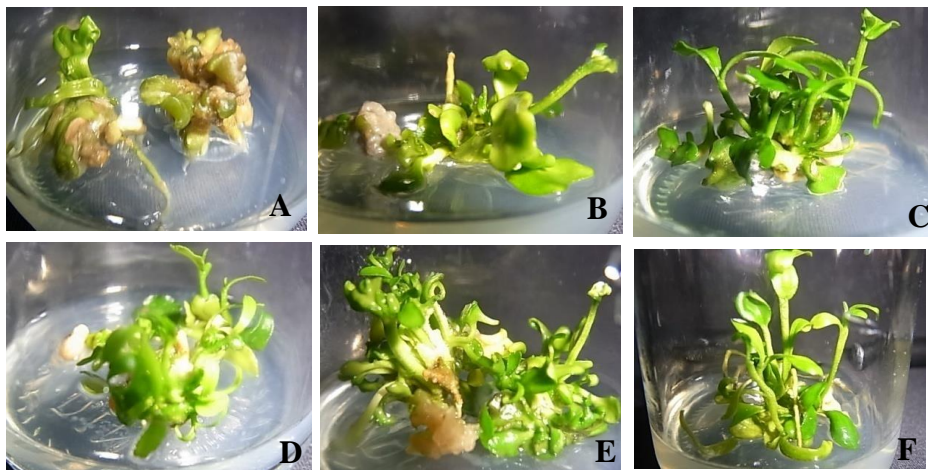
dalam medium menyebabkan berbagai macam abnormalitas dalam pertumbuhan embrio *Brassica napus* L. Peningkatan sukrosa dari 3 ke 6% (dari 88 ke 175mM) menurunkan masa embriogenik, protein terlarut, kandungan fenolik dan aktivitas peroksidase pada kultur suspensi sel *Phoenix dactylifera* (Zouini dan Hadrami, 2004). Namun demikian, peningkatan konsentrasi sukrosa dalam media kultur dapat meningkatkan perkembangan embrio somatik pada *Dianthus caryophyllus* L (Karami *et al.*, 2008), *Brassica napus* (Lesak dan Przywara, 2003) dan *Glycine max* L. (Korbes dan Droste, 2005).



Gambar 4. Pertumbuhan embrio somatik jeruk selama 2 minggu (A-C) dan 4 minggu (D-F) kultur pada media MT dengan perlakuan fotoperiode yang berbeda. A dan D fotoperiode 8 jam hari⁻¹; B dan E. fotoperiode 12 jam hari⁻¹; C dan F. fotoperiode 16 jam hari⁻¹.



Gambar 5. Pengaruh perlakuan fotoperiode yang berbeda terhadap berat basah embrio somatik jeruk pada umur kultur 2 dan 4 minggu kultur. Huruf yang sama pada masing-masing umur kultur menunjukkan tidak berbeda nyata dengan uji BNT 5%.



Gambar 6. Planlet hasil regenerasi dari embrio somatik yang dikultur pada media dengan perlakuan sukrosa dan fotoperiode. A-C perlakuan sukrosa 25, 50, dan 100 mM; D-F perlakuan fotoperiode 8, 12, dan 16 jam hari⁻¹.

Selain sukrosa, cahaya juga merupakan faktor yang dapat mempengaruhi pembentukan embrio somatik dan regenerasi tanaman secara in vitro (Meneses *et al.*, 2005). Walaupun cahaya tidak esensial diperlukan untuk pembentukan embrio tetapi cahaya dapat meningkatkan kecepatan pembentukan embrio pada beberapa tanaman seperti wortel dan sledri (Uozumi *et al.*, 1993). Menurut Kaldenhoff *et al.* (1994) dan D'Onofrio *et al.* (1998), kondisi cahaya merah memacu konversi pro embrio menjadi embrio, sementara cahaya putih memacu perkembangan tanaman in vitro pada tanaman *Arabidopsis thaliana* dan *Cydonia oblonga* Mill.

Pengaruh pencahayaan yang penting untuk embriogenesis somatik adalah fotoperiode. Fotoperiode mempengaruhi efisiensi embriogenesis somatik dan pengaruhnya tergantung pada kultivar tanaman yang dikultur. Induksi embrio somatik di bawah kondisi fotoperiode kurang dari 16 jam hari⁻¹ dapat meningkatkan efisiensi embriogenesis somatik pada beberapa kultivar (Górska-Koplińska *et al.*, 2010) tetapi tidak berpengaruh pada kultivar yang lain.

Fotoperiode 16 jam hari⁻¹ menghambat induksi kultur kalus embriogenik dan embrio somatik pada *Vitellaria paradoxa* (Baker *et al.*, 1994), tetapi memberikan frekuensi maksimum untuk perkembangan planlet dari embrio somatik seledri dan diperlukan untuk menghasilkan planlet yang sehat. Selama tahapan regenerasi, fotoperiode mempengaruhi kandungan klorofil sel. Fotoperiode yang lebih lama meningkatkan kandungan klorofil

pada sel embrio somatik seledri, yang mencapai level maksimum pada fotoperiode 16 jam hari⁻¹ atau lebih (Uozumi *et al.* 1993). Kandungan klorofil sel pada embrio somatik seledri berkorelasi dengan level warna hijau embrio somatik.

KESIMPULAN

Pertumbuhan embrio somatik dipengaruhi oleh penambahan sukrosa dalam medium dan fotoperiode. Semakin tinggi sukrosa yang ditambahkan dalam medium penurunan bobot basah embrio somatik semakin meningkat. Bobot basah embrio somatik yang dikulturkan dengan fotoperiode 12 jam hari⁻¹ lebih tinggi dibandingkan dengan fotoperiode 8 jam hari⁻¹. Namun demikian apabila fotoperiode ditingkatkan menjadi 16 jam hari⁻¹, bobot basah embrio somatik mengalami penurunan. Embrio somatik yang diinduksi pada medium yang mengandung sukrosa tinggi (246 mM) mampu beregenerasi menjadi planlet dalam jumlah lebih banyak dan berukuran lebih tinggi dibandingkan dengan sukrosa rendah. Sedangkan perlakuan fotoperiode 12 jam hari⁻¹ menghasilkan jumlah planlet lebih banyak dibandingkan fotoperiode 8 dan 16 jam hari⁻¹. Namun demikian, perlakuan fotoperiode 16 jam hari⁻¹ mampu menghasilkan planlet yang berukuran lebih tinggi dibandingkan perlakuan fotoperiode 8 dan 12 jam hari⁻¹.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Hibah Penelitian Kerja Sama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T) 2011.

DAFTAR PUSTAKA

- Aina, O., K. Quesenberry, M. Gallo, 2012. Photoperiod affects *in vitro* flowering in wild peanut *Arachis paraguariensis*. American Journal of Plant Sciences 3(5): 567-571.
- Ali, A., S. Naz, J. Iqbal. 2007. Effect of different explants and media compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). Pak. J. Bot. 39(6): 1961-1977.
- Alkhateeb, A.A. 2006. Somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Sukary in response to sucrose and polyethylene glycol. Biotechnology 5(4): 466-470.
- Angoshtari, R., R.T. Afshari, S. Kalantari, M. Omid. 2009. Effects of abscisic acid on somatic embryogenesis and induction of desiccation tolerance in *Brassica napus*. Asian J. Plant Sci. 8(4): 276-284.
- Anonim. 2007. Prospek dan Arah Pengembangan Agribisnis Jeruk. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Departemen Pertanian.
- Baker, C.M., J.A. Burns, H.Y. Wetzstein. 1994. Influence of photoperiod and medium formulation on peanut somatic embryogenesis. Plant Cell Reports 13(3-4): 159-163.
- Chaari-Rkhis A., M. Maalej, S. Ouled Messaoud, N. Drira. 2006. *In vitro* vegetative growth and flowering of olive tree in response to GA3 treatment. African Journal of Biotechnology 5(22): 2097-2302.
- Chang C., and W.C. Chang. 2003. Cytokinin promotion of flowering in *Cymbidium ensifolium* var. *misiricors* *in vitro*. Plant Growth Regulation 39: 217-221.
- Corredoira, E., A. Ballester, M. Vieitez. 2003. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. Ann. Bot. 92: 129-136.
- Cvikrova, M., M. Hrubcova, M. Vagner, I. Machackova, J. Eder. 1994. Phenolic acids and peroxidases activities in alfalfa (*Medicago sativa*) embryogenic cultures after ethephon treatment. Physiol. Plant 91: 226-233.
- D' Onofrio, C., S. Morini, G. Bellocchi. 1998. Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 53: 91-98.
- Fernando, J.A., M.L.C. Vieira, I.O. Gerardi, B. Appezzato-da-Glória. (2002), Anatomical study of somatic embryogenesis in *Glycine max* (L.) Merrill. Braz. Arch. Biol. Technol., 45: 277-286.
- Garcia-Luis, A., P. Santamarina, J.L. Guardiola. 1989. Flower formation from *Citrus unshiu* buds cultured *in vitro*. Annals of Botany 64: 515-519.
- Gatica, A.M., G. Arrieta, A.M. Espinoza. 2008. Direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. cvs Caturra and Catuai: effect of triacontanol, light condition, and medium consistency. Agronomía Costarricense 32(1): 139-147.
- Gogate, S.S., R.S. Nadgauda. 2003. Direct induction of somatic embryogenesis from immature zygotic embryo of cashewnut (*Anacardium occidentale* L.). Sci. Hort. 97: 75-82.
- Gonzalez, JM, E. Frierio, N. Jouve. 2001. Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* Desf. cultivars. Plant. Breed. 120: 513-517.
- Gorska-Koplinska, K., A. Robek-Sokolnik, J. Ryszard, Gorecki, D.J. Michalczyk. 2010. Capacity for somatic embryogenesis in different Pea cultivar. Pol. J. Natur. Sc. 25(2): 115-122.

- Jumin, H.B., N. Nito (1995). Embryogenic protoplast cultures of orange Jessamine (*Murraya paniculata*) and their regeneration on plant flowering *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 41: 227-279.
- Kaldenhoff, R., U. Henningsen, G. Richter. 1994. Gene activation in suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana* during blue light-dependent plantlet regeneration. Planta 195: 182-187.
- Kantharajah, A.S., P.G. Golegaonkar. 2004. Somatic embryogenesis in egg plant. Sci. Hortic. 99: 107-117.
- Karami, O., A. Deljau, A.M. Pour. 2008. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). J. Sci. Technol. Agric. Natur. Resour. 12(43): 11-16.
- Korbes, A.P., A. Droste. 2005. Carbon source and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. Pesq. Agropec. Bras. Brasilia 40(3): 211-216.
- Lai, F.M., B.D. McKersie. 1994. Regulation of starch and protein accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. Plant. Sci. 100: 211-219.
- Langens-Gerrits, M., G.J. De Klerk, A. Croes. 2003. Phase change in lily bulblets regenerated *in vitro*. Physiologia Plantarum 119: 590-597.
- Lazzeri, P.A., D.F. Hildebrand, G.B. Collins. 1987. Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 10:209-220.
- Lesak, H., L. Przywara. 2003. The effect of carbohydrate source on the development of *Brassica napus* L. immature embryo *in vitro*. Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica 45(2): 183-190.
- Lin, C.S., C.T. Chen, H.W. Hsiao, W.C. Chang. 2005. Effects of growth regulators on direct flowering of isolated ginseng buds *in vitro*. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 83: 241-244.
- Martin, K.P. 2003. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis on seed coat explants of cashew (*Anacardium occidentale* L.). Sci. Hort. 98: 299-304.
- Martin, A.B., Y. Cuadrado, H. Guerra, P. Gallego, O. Hita, L. Martin, A. Dorado, N. Villalobos. 2000. Differences in the contents of total sugars, reducing sugars, starch and sucrose in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea* L. Plant Sci. 154: 143-151.
- Meneses, A., F.D. Dora, M. Muñoz, G. Arrieta, A.M. Espinoza. 2005. Effect of 2,4-D, hydric stress and light on *indica* rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. Rev. Biol. Trop. 53 (3-4): 361-368.
- Mohamed, V., S. Wang, C.S. Thiruvengadam, M. Jayabalan. 2004. *In vitro* plant regeneration via somatic embryogenesis through cell suspension cultures of horsegram [*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.]. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 40: 284-289.
- Morini, S., C. D'Onofrio, G. Bellocchi, M. Fisichella. 2000. Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 63: 47- 55.
- Murashige, T., D.P.H. Tucker. 1969. Growth factor requirements of Citrus tissue culture. In. Proc. Ist. Intl. Citrus Symp. Riverside (1968-1969) 3 : 1155 - 1161.
- Nhut, D. T., B.V.T. Vinh, T.T. Hien, N.P. Huy, N.B. Nam, H.X. Chien. 2012. Effects of spermidine, proline and carbohydrate sources on somatic embryogenesis from main root transverse thin cell layers of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et. Grushv.). African Journal of Biotechnology 11(5): 1084-1091.
- Satoh, K., H. Ooka, A. Wakai, Y. Takahara, K. Yamamoto. 2000. Osmotic and non-osmotic induction of somatic embryogenesis by sucrose at high concentration in *Daucus carota* L. Plant Biotechnology 17 (2): 155-158.

- Singh, B., S. Sharma, G. Rani, G.S. Virk, A.A. Zaidi, A. Nagpal. 2006. *In vitro* flowering in embryogenic cultures of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour and *C. deliciosa* Tenora). African Journal of Biotechnology 5(16): 1470-1474.
- Slesak, H., L. Przywara. 2003. The effect of carbohydrate source on the development of *Brassica napus* L. immature embryo in vitro. Acta Biologica Cracoviensia series Botanica 45(2): 183-190.
- Tangolar, S.G., S. Buyukalaca, F. Ergenoglu. 2008. High efficiency somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of grapevine: the effect of genotype, media, 2,4-D, and incubation conditions. Turk. J. Agric. For. 32: 311-317.
- Torne, J.M., L. Moysset, M. Santos, E. Simon. 2001. Effects of light quality on somatic embryogenesis in *Araujia sericifera*. Physiologia Plantarum 111(3): 405-411.
- Triqui, Z.A., A. Guedir, A. Chlyah, H. Chlyah, V. Souvannavong, R. Haicour, D. Sihachakr. 2008. Effect of genotype, gelling agent, and auxin on the induction of somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). C. R. Biologies 331: 198-205.
- Uozumi, N., K. Kohketsu, A. Okamoto, T. Kobayashi. 1993. Light dependency in celery somatic embryogenesis and plantlet development in suspension culture. Plant Tissue Culture Letters 10 (1): 25-32.
- Vaz, A.P.A., L. de Cassia, F. Riberiro, G.B. Kerbaux GB. 2004. Photoperiod and temperature effects on *in vitro* growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. Plant Physiol. and Biochem. 42: 411-415.
- Vengadesan, G., A. Ganapathi, R.P. Anand, N. Selvaraj. 2003. In vitro propagation of *Acacia sinuata* (lour.) Merr. from nodal segments of a 10 year old tree. In Vitro Cellular and Development Biology Plant 39: 466-470.
- Yancheva, S.D., V. Roichev. 2005 Carbohydrate source can influence the efficiency of somatic embryogenesis in seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). Biotechnol. Biotechnol. 19(2): 62-66.
- Zouine, J., I. El Hadrami. 2004. Somatic embryogenesis in *Phoenix dactylifera* L: effect of exogenous supply of sucrose on protein, sugar, phenolics and peroxidase activities during the embryogenic cell suspension culture. Biotechnology 3(2): 114-118.